

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-123126

(43)Date of publication of application : 04.06.1987

(51)Int.Cl.

A61K 35/12

A61K 35/14

A61K 37/04

(21)Application number : 61-193057

(71)Applicant : YOSHITOMI PHARMACEUT IND LTD

(22)Date of filing : 19.08.1986

(72)Inventor : HASHIMOTO YOSHIYUKI
CHIBA KENJI

(30)Priority

Priority number : 36018375 Priority date : 20.08.1985 Priority country : JP

(54) CELL DNA SYNTHESIS INHIBITORY FACTOR

(57)Abstract:

PURPOSE: The titled factor, produced from human lymphocytic cells and useful for inhibiting transplantation rejection of transplanted patients or treating autoimmune disease, allergy, abnormal lymphocytosis and cancer.

CONSTITUTION: A cell DNA synthesis inhibitory factor, separated and purified from a cultivation supernatant of T cell hybridoma prepared by fusing human lymphocytic cells or human peripheral blood lymphocytic cells, e.g. T cell groups separated as human peripheral blood lymphocytes or human lymphocytes, etc., with human leukemic cell strains, etc., and having the following properties; (i) Molecular weight; 45,000W70,000 (measured by gel filtration chromatography). (ii) Unadsorbed on immobilized concanavalin A-sepharose. (iii) Isoelectric point; 4.5W5.5. (iv) Eluted with FPLC-Mono Q anion exchange chromatography at 0.5W0.7M common salt concentration. (v) Physico-chemical properties shown in the table. The above-mentioned factor is capable of inhibiting cell DNA synthesis of a wide range beyond animal species, e.g. humans, rats, mice, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-123126

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)6月4日

A 61 K 35/12
35/14
37/04

7138-4C

7138-4C

7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

⑭ 発明の名称 細胞DNA合成抑制因子

⑰ 特 願 昭61-193057

⑱ 出 願 昭61(1986)8月19日

優先権主張 ⑲ 昭60(1985)8月20日 ⑳ 日本(JP)㉑ 特願 昭60-183750

⑲ 発 明 者 橋 本 嘉 幸 仙台市三神峯1-3-3-506
⑲ 発 明 者 千 葉 健 治 清瀬市上清戸2-12-19 吉富製薬清瀬寮
⑲ 出 願 人 吉富製薬株式会社 大阪市東区平野町3丁目35番地
⑲ 代 理 人 弁理士 高宮城 勝

明 細 書

(産業上の利用分野)

1. 発明の名称

細胞DNA合成抑制因子

本発明はヒト由来の新規な細胞DNA合成抑制因子に関する。

2. 特許請求の範囲

ヒトリンパ球細胞に由来し、以下の性質によって特徴づけられる細胞DNA合成抑制因子。

(a) 分子量が45,000 ~ 70,000 (ゲル濾過クロマトグラフィー)である、

(b) 固定化コンカナバリンA-セファロースに非吸着性である、

(c) 等電点が4.5 ~ 5.5である、

(d) PPLC-Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーにて食塩濃度0.5 ~ 0.7 Mで溶出される、

(e) デオキシリボスクレアーゼ、リボスクレアーゼ、過ヨウ素酸処理に非感受性で、トリブシン、 α -キモトリブシン、プロナーゼに感受性である、

(f) pH 2 ~ 7 の範囲で安定である、

(g) 90℃、30分処理にて失活する。

3. 発明の詳細な説明

(従来の技術)

各種のレクチンや同種抗原等の刺激により活性化されたリンパ球、特にT細胞から放出される細胞のDNA合成、分裂、増殖を抑制する作用を有する生理活性物質は、これまでに多数報告されている。たとえば、NambaらはコンカナバリンA、あるいはオブアルブミンで刺激されたラット脾細胞から、マウスのL細胞あるいはフィトヘマグルチニンで活性化されたラットリンパ節細胞のDNA合成を抑制する作用を有する生理活性因子 (inhibitor of DNA synthesis, IDS) が放出されることを見出し、精製することによって、分子量80,000、等電点2.7 ~ 2.9の糖タンパク質であることを報告した(Inflammation, 1巻、5頁)。

また、AuneらはコンカナバリンAで刺激されたマウス脾細胞から、ヒツジ赤血球に対する抗体産

生を抑制する作用を有する生理活性因子(soluble immune response suppressor, SIRS)が放出されることを見出し、該因子は分子量48,000~67,000の糖タンパク質でLyt 23抗原陽性のサブレッサーT細胞から産生され、マクロファージの産生する過酸化水素により活性化体になることを報告した(J. Immunol., 127巻、1828頁)。さらに Schnaper らはヒト脾細胞をコンカナバリンAなどで刺激した場合、分子量110,000~150,000のSIRS様活性を有する生理活性因子が産生されることを報告している(J. Immunol., 132巻、2429頁)。

また、GreeneらによってコンカナバリンAで刺激されたヒト末梢血リンパ球から、フィトヘマグルチニンで活性化されたヒトT細胞の増殖を抑制する作用を有する生理活性因子(soluble immune suppressor supernatant of T cell proliferation, SISS-T)が放出されることが見出された。SISS-Tは分子量が30,000~40,000でその活性はN-アセ

チル-D-グルコサミンによって阻害されることが報告されている(J. Immunol., 126巻 1185頁)。

一方、本発明者らによって、コンカナバリンAで刺激されたラットサブレッサーT細胞から、ラットあるいはマウス骨髓細胞のDNA合成を抑制する作用を有する生理活性因子(stimulated T cell-derived inhibitory factor for cellular DNA synthesis, STIF)が産生されることが見出された。ラットSTIFは分子量45,000~50,000、等電点5.1~5.6、コンカナバリンAセファロース非吸着性のタンパク質で、ラット、マウスあるいはヒト由来の種々の細胞のDNA合成を抑制する活性を有することが報告されている(J. Immunol., 134巻 1019頁)。

(発明が解決しようとする問題点)

以上のように、種々の活性化リンパ球由来生理活性因子の存在は、多数報告されているが、ほとんどの場合それらの分子性状を知るに足る充分量を得られておらず、しかも、単離精製及びその作

用機序の解明は充分ではないのが現状である。

(問題を解決するための手段)

本発明者らはこれらの実状に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、ヒトリンパ球細胞から新規な細胞DNA合成抑制因子が産生されることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、ヒトリンパ球細胞に由来し、以下の性質によって特徴づけられる細胞DNA合成抑制因子に関する。

- (a) 分子量が45,000~70,000(ゲル濾過クロマトグラフィー)である、
- (b) 固定化コンカナバリンA-セファロースに非吸着性である、
- (c) 等電点が4.5~5.5である、
- (d) PPLC-Mono D 陰イオン交換クロマトグラフィーにて食塩濃度0.5~0.7Mで溶出される、
- (e) デオキシリボスクレアーゼ、リボスクレアーゼ、過ヨウ素酸処理に非感受性で、トリブシン、 α -キモトリブシン、プロナーゼに感受性である、

(f) pH 2~7の範囲で安定である、

(g) 90℃、30分処理にて失活する。

本発明に用いられるヒトリンパ球細胞としては、ヒト末梢血リンパ球が用いられ、これらの細胞を無刺激または各種の刺激剤により刺激することもできる。さらにヒトリンパ球としては分離されたT細胞集団、あるいはT8抗原またはLeu 2抗原陽性のサブレッサーT細胞-細胞障害性T細胞亜群など、特定の細胞群を用いることもできる。

刺激剤としては、本発明の細胞DNA合成抑制因子を誘導し得るものであればいずれでもよいが、たとえばコンカナバリンA(ConA)、フィトヘマグルチニン(PHA)、ボークウィードマイトジェン(PWM)のようなレクチン、リボポリサッカライド(LPS)または各種抗原やホルボールエステル(たとえば、 4β -ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート:PHA)などが挙げられ、これらを単独あるいは組み合わせで使用することができる。

さらに、本発明の細胞DNA合成抑制因子を産生する細胞として、ヒト末梢血リンパ球とヒト白血病細胞株などを融合させることによって得られるヒト雑種細胞培養株(T細胞ハイブリドーマ)およびそのクローンも使用することができる。

本発明の細胞DNA合成抑制因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマの作製法としては、通常、細胞融合に用いられる方法を用いることができるが、ヒトリンパ球細胞として、無刺激あるいは刺激剤にて刺激されたヒト末梢血リンパ球および分離されたT細胞集団、あるいはT₈抗原またはLeu 2抗原陽性のサブレッサーT細胞-細胞障害性T細胞亜群などを使用することができる。一方、細胞融合に用いる親細胞株としては、8-アザグアニン、6-チオグアニン、あるいは5-ブロモデオキシウリジンなどの種々の薬剤に耐性であり、しかも、他の生理活性物質を産生しない CCRF-CEM, CCRF-BSB2, MOLT-3, MOLT-4などのヒトT細胞性白血病細胞株、さらに種々の蛋白質合成阻害

剤および核酸合成阻害剤、またはその両者によって処理された種々のヒトT細胞性白血病細胞株を使用することができる。ここで、蛋白質合成阻害剤としては、既知の真核細胞の蛋白質合成阻害剤が使用可能であるが、エメチン塩酸塩など不可逆的蛋白質合成阻害剤が好ましい。また、核酸合成阻害剤としてDNA合成阻害剤が挙げられるが、具体的には、アクチノマイシンD、アドリアマイシン、 α -アマンチン、エチジウムブロマイド、リファンピシンなどが挙げられる。細胞融合反応の誘起には、センダイウイルスなどの種々のウイルスの他、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール(PPG)、ポリビニルアルコール(PVA)などの細胞融合誘導物質を用いることができる。

融合したハイブリドーマの選別には、親株として種々の薬剤耐性株を使用した場合には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む選択培地等の親株が増殖不可能な選択培地を使用する

ことが望ましい。また、親株として薬物処理ヒトT細胞性白血病細胞株を用いた場合には、通常の培地で選別することが可能である。

本発明の細胞DNA合成抑制因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマに関しては、通常の方法、たとえば、限界希釈法、半固体培地培養法(軟寒天法)などによってクローニングを行なうことができ、得られたクローンについては、活性を測定し、本因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマクローンを選別する。

本因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマクローンの選別のための活性測定法としては、ラットおよびマウスの骨髓細胞、胸腺細胞、脾細胞またはヒト末梢血リンパ球などのリンパ系細胞を、無刺激あるいはコンカナバリンA(Con A)、フィトヘマグルチニン(PHA)、ボークウィードマイトジェン(PWM)などのマイトジェンや、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、コロニー刺激因子(CSF)等の各種

刺激剤によって刺激して誘導される細胞の³H-チミジン取り込みに対する抑制効果をこれらの細胞のDNA合成抑制効果として測定する。この際、細胞DNA合成抑制因子の活性画分として用いられる細胞培養上清中にチミジンが混在する場合には、上記種々の細胞の細胞数の増加に対する抑制効果あるいは、これらの細胞の産生する特異的な物質の産生抑制効果などにより活性評価することが望ましい。

選別されたクローンに関しては、血清添加の有無、細胞濃度、培養時間、刺激物質、培養のスケール等についての至適条件を検討した後、永続的に培養を行なうことが可能である。

このように、本発明の細胞DNA合成抑制因子は、これらの細胞の培養上清より実質上無限に取得することができる。

また、本発明の細胞DNA合成抑制因子は、遺伝子工学的手段により、大腸菌あるいはヒト培養細胞株などで生産することも可能である。

上記の細胞、あるいは生産方法によって得られた、本発明の細胞DNA合成抑制因子の分離精製は、一般にタンパク質の分離に用いられている常法、たとえば塩析、遠心分離、透析、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、限外濾過および凍結乾燥などの方法を組み合わせることによって実施できる。

即ち、本発明において得られた培養上清を硫酸塩析などで濃縮した後に、分子量10,000~200,000の物質の分離に適した担体を用いるゲル濾過を行ない、さらに活性画分を固定化コンカナバリンAを用いるアフィニティークロマトグラフィーに付することにより、コンカナバリンAセファロースに非吸着の画分として得られる。さらに活性画分を、ウルトロデックスを用いた分取用等電点電気泳動を行なうことや、PPLC-Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーを行なうことによって得ることができる。保存に際しては、凍結乾燥するの

が好ましい。

このようにして得られる本発明の細胞DNA合成抑制因子は次のような性質を有するタンパク性物質である。

(1) 培養上清を硫酸塩析した場合、0~50%飽和硫酸画分に活性が認められ、50~90%飽和画分にはほとんど活性が認められない。

(2) 分子量：セファクリルS-200 (ファルマシア社製) のカラムを用いたゲル濾過により、分子量は45,000~70,000である(第1図)。

(3) 固定化コンカナバリンA-セファロースに非吸着性である(第2図)。

(4) 等電点：ウルトロデックス(LKB社製)を用いた分取用等電点電気泳動(pH3~10)を行なうことによって、等電点は4.5~5.5である(第3図)。

(5) 陰イオン交換クロマトグラフィー：PPLC-Mono Q カラム(ファルマシア社製)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーをpH8.で0~

1Mの食塩の直線濃度勾配で行なうことにより、食塩濃度0.5~0.7Mで溶出される(第4図)。

(6) 物理化学的性状：デオキシリボスクレアーゼ、リボスクレアーゼA処理および過ヨウ素酸酸化には非感受性であるが、トリプシン、 α -キモトリプシン、プロナーゼ処理に感受性であり、pH2~7の範囲で安定であるが、90℃、30分間の熱処理にて失活する(第1表)。

第1表：細胞DNA合成抑制因子の
物理化学的性状

| 処 理 | |
|-------------------|------|
| デオキシリボスクレアーゼ | 非感受性 |
| リボスクレアーゼ | 非感受性 |
| トリプシン | 感受性 |
| α -キモトリプシン | 感受性 |
| プロナーゼ | 感受性 |
| 過ヨウ素酸 | 非感受性 |
| pH 2 | 安 定 |
| pH 4 | 安 定 |
| pH 7 | 安 定 |
| 90℃、30分間 | 不安定 |

また、他の生化学的性質として、

(7) 2-メルカプトエタノール、レバミゾール

を添加しても活性は阻害されない、

(8) N-アセチル-D-グルコサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン、 α -メチル-D-マンノシドの添加によっても活性は阻害されない、

(9) L-アルギニンおよびL-オルニチンの添加によっても活性は阻害されない。

10 生物活性：本発明の細胞DNA合成抑制因子は以下に示す生物活性を有する。

イ) ラット骨髓細胞、およびマウス骨髓細胞、ラット胸腺細胞の³H-チミジン取り込みを指標とした細胞のDNA合成を抑制する。

ロ) コンカナバリンA(Con A)、フィトヘマグルチニン(PHA)などのT細胞マイトジェンで刺激されたヒト、ラットおよびマウスのT細胞の増殖を抑制する。

ハ) ボークウィードマイトジェン(PWM)、スタフィロコッカス・アウレウス・コウワン1(SAC)などのB細胞マイトジェンで刺激されたヒト、ラット、およびマウスのB細胞の増殖および免疫グ

ロブリン G (IgG) あるいは IgM の産生を抑制する。

ニ) ヒト、マウスあるいはラット由来の培養腫瘍細胞 (CCRF-SB、RPMI 8226、HSB-2、K 562、NS-1、SP-2、L 1210、P 388、U 937、RPMI 1788 など) の ^3H -チミジン取り込みを指標とした DNA 合成および増殖を抑制するなどの抗腫瘍活性を有する。

ホ) ヒト、マウス由来 T 細胞の IL 2 依存性増殖を抑制する。

ヘ) アクチノマイシン D 処理したマウス L 929 細胞に対しては、24 時間以内で細胞障害性を示さない。

(作用及び発明の効果)

本発明の細胞 DNA 合成抑制因子は、上記に示されるような諸性質を有し、従来のヒト T 細胞由来抑制性リンホカインとは異なる新規なものである。さらに本因子はヒト、ラット、マウスなど広く動物種を越えた細胞の DNA 合成を抑制するものである。

合成抑制因子の産生および精製

フィコールバック (ファルマシア社製) を用いた密度勾配遠心法により得たヒト末梢血リンパ球を、2% 牛胎児血清 (熱不活化)、カナマイシン $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホネイト (HEPES) 10 mM を含む RPMI 1640 培地にて 5×10^6 個/ ml とし、コンカナバリン A (シグマ社製) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ および 2-メルカプトエタノール $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 存在下、5% 炭酸ガス含有空気中、 37°C で 48 時間培養する。その後、遠心により細胞を除去して得られた培養上清 (h-ConA Sup) に、 4°C にて固型硫酸アンモニウムを添加し、まず 50% 飽和硫酸アンモニウムと、さらにその上清を 90% 飽和硫酸アンモニウムとに分画し、それぞれ得られた沈澱を、冷却高速遠心により収集後、リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、約百分の一量に濃縮する。残存する硫酸アンモニウムを除去するために、リン酸緩衝液 (pH 7.4) で一晚透析し、濾過滅菌後、

それゆえに、本因子は、骨髄、腎、心臓などの異種または同種移植をうけた患者の移植拒絶反応の抑制のため、あるいは全身性エリトマトーデス (SLD)、リウマチ性関節炎のような自己免疫疾患、アレルギーさらには白血病のようなリンパ球増殖異常および癌の治療に応用することができる。また、本因子は広く、医学、薬学の分野における試薬等としても用いることが可能である。

本発明の細胞 DNA 合成抑制因子を医薬として用いる場合は、通常の製剤技術にしたがって、製剤化することができ、たとえば原体を担体、賦形剤、希釈剤などと混合して散剤、錠剤、カプセル剤、注射剤などの形で提供され得る。

(実施例)

以下、実施例および実験例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例および実験例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

(a) ヒト末梢血リンパ球を用いた細胞 DNA

4℃ で保存する。このようにして得られた濃縮 h-ConA Sup は、ラット骨髄細胞などを用いて活性を測定した後、精製に用いた。活性は 0~50% 飽和硫酸アンモニウムに濃縮される。

セファクリル S-200 (ファルマシア社製) のカラム ($1 \times 90 \text{ cm}$) を用い、リン酸緩衝液 (pH 7.4) にてゲル濾過を行ない、標準タンパク質 (ファルマシア社製: リボスクレアーゼ A、キモトリプシノーゲン A、オブアルブミン、牛血清アルブミン) を用いて分子量の検査線を作製し、ゲル濾過により得られた各画分について、ラット骨髄細胞を用いた活性評価により、分子量を測定したところ、第 1 図に示したように活性ピークはオブアルブミンと牛血清アルブミンの間に溶出され、分子量は 45,000 ~ 70,000 であった。

セファクリル S-200 カラムを用い分画し、得られた活性画分を限外濾過により濃縮し、固定化コンカナバリン A セファロース (ファルマシア社製) のカラム ($1 \times 7.5 \text{ cm}$) を用いアフィニテ

イークロマトグラフィーを行なう。溶出は最初リン酸緩衝液(pH 7.4) 75 mlを用いて行ない、コンカナバリンA非吸着性画分を得る。次に、0.2 M α -メチル-D-マンノシドを含むリン酸緩衝液(pH 7.4) 50 mlを用いて溶出を行ない、コンカナバリンA吸着性画分を得る。各画分について、リン酸緩衝液で一晩透析した後に、ラット骨髓細胞を用いた活性評価により、第2図に示したように活性はコンカナバリンA非吸着性の画分に認められた。

コンカナバリンA非吸着性の画分を限外濾過により濃縮し、脱イオン水で一晩透析した後、ウルトロデックス(LKB社製) 4 g、アンホライン pH 3-10(LKB社製) 5 mlおよび脱イオン水を混合し、約100 mlのゲルを作製し、18 w定電力で6~8時間、4℃にて等電点電気泳動を行なう。泳動終了後、直ちにゲルを30画分に分画し、それぞれの画分のpHを測定した後、脱イオン水により、ゲルからタンパク質の溶出を行な

う。さらにリン酸緩衝液(pH 7.4)で一晩透析した後、ラット骨髓細胞を用いた活性評価を行なったところ、第3図に示したように、活性はpH 4.5~5.5の範囲に認められた。

また、コンカナバリンA非吸着性の画分を、限外濾過により濃縮した後、脱イオン水で一晩透析し、500 μ gを、FPLC-Mono Q陰イオン交換クロマトグラフィー(ファルマシア社製)により、分画を行なう。Mono Qカラムは、まずトリス-塩酸緩衝液(トリスヒドロキシアミノメタン 30 mM、pH 8.0)で平衡化しておき、試料添加後、流速1 ml/分で、3 mlのトリス-塩酸緩衝液で溶出後、0~1.0 M食塩による直線的濃度勾配(10 ml)で溶出する。各1 mlの画分を分取し、リン酸緩衝液(pH 7.4)で一晩透析後、ラット骨髓細胞を用いた活性評価を行なったところ、第4図に示したように、活性は0.5~0.7 Mの食塩で溶出されてくる画分に認められた。

(b) 物理化学的および生化学的性状

部分精製した本細胞DNA合成抑制因子について、デオキシリボスクレアーゼ、リボスクレアーゼA、トリプシン、 α -キモトリプシン、プロナーゼ処理、過ヨウ素酸酸化、温度および熱安定性を検討した。デオキシリボスクレアーゼ(シグマ社製) 50 μ g/ml、リボスクレアーゼA(シグマ社製) 50 μ g/ml、トリプシン(シグマ社製) 50 μ g/ml、 α -キモトリプシン(シグマ社製) 50 μ g/ml、プロナーゼ(シグマ社製) 50 μ g/mlをそれぞれ細胞DNA合成抑制因子に添加し、37℃で3時間処理し、トリプシン処理群に関しては、ソイビントリプシンインヒビター150 μ g/mlを処理終了時に添加した後、ラット骨髓細胞を用いた活性評価を行なった。また過ヨウ素酸酸化は、過ヨウ素酸ナトリウム(和光純薬製) 5 mMを添加し、冷暗所で3時間放置し、処理終了時に、ショ糖5% w/vを添加し、30分間放置した後、リン酸緩衝液(pH 7.4)で一晩透析し、ラット骨髓細胞を用いて活性評価を行なった。

その結果、前出の第1表の通り、細胞DNA合成抑制因子はデオキシリボスクレアーゼ、リボスクレアーゼ処理および過ヨウ素酸酸化には安定であるが、トリプシン、 α -キモトリプシン、プロナーゼ処理に感受性であった。さらにpH 2~8で安定であるが、90℃、30分間の熱処理にて失活する。さらに、本発明の細胞DNA合成抑制因子の活性に対する各物質の影響について検討した。

反応中、 10^{-4} M 2-メルカプトエタノール、5 μ g/ml レバミゾール、50 mM N-アセチル-D-グルコサミン、50 mM N-アセチル-D-ガラクトサミン、50 mM α -メチル-D-マンノシド、10 mM L-アルギニンおよび10 mM L-オルニチンを添加し、ラット骨髓細胞を用いた活性評価を行なったところ、いずれの物質によっても本発明の細胞DNA合成抑制因子の活性は阻害されなかった。

本因子の活性は、L-アルギニン(0.5~20 mM)およびL-オルニチン(0.5~20 mM)

の添加によっても阻害されないことから、アルギナーゼとは異なる。またソイビートリブシニンヒビターなどのプロテアーゼインヒビターの添加によっても阻害されないことから、種々のプロテアーゼとも異なる。さらに本因子は、ヒト末梢血リンパ球由来のリンホトキシン、腫瘍壊死因子(TNF)あるいはインターフェロナーとも、分子量、コンカナバリンAセファロース非吸着性および種々の物理化学的および生化学的性状の点で異なる新規な細胞DNA合成抑制因子である。

実施例2: ヒトT細胞ハイブリドーマによる産生

比重遠心法によって得られたヒト末梢血リンパ球を10%牛胎児血清を含むRPMI 1640 培地にて 5×10^6 個/mlに調整し、Con A を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、37℃、5%炭酸ガス条件下で3日間培養した後、血清およびCon A を含まないRPMI 1640 培地を用いて3回洗浄し、コンカナバリンA刺激ヒト末梢血リンパ球を得た。この細胞と8-アザグアニン耐性ヒトT白血病細胞株 CCRF-CEM または

常の10%牛胎児血清を含むRPMI 1640 培地に交換し、ラット骨髓細胞の³H-チミジン取り込みを指標とするアッセイを行なった。抑制活性の認められたウエルの細胞に関しては、直ちに限界希釈法によるクローニングを行ない、得られたクローンの培養上清中に含まれる抑制活性をラット骨髓細胞を用いた活性評価にて測定した。

以上の方法により、8-アザグアニン耐性CCRF-CEMを親株とするハイブリドーマクローン HC-6 および8-アザグアニン耐性MOLT-4を親株とするハイブリドーマクローン HM-53を樹立した。両者の細胞DNA合成抑制因子産生における至適細胞濃度および培養時間について検討したところ、無血清RPMI 1640 培地中、いずれも 2×10^6 個/mlで72時間培養した後の上清中に最大量の細胞DNA合成抑制因子が産生されることが明らかとなった。このハイブリドーマクローンの培養上清中に産生された本発明の細胞DNA合成抑制因子は、実施例1の方法などに準じ、精製することが

同 MOLT-4 とをそれぞれ無血清RPMI 1640 培地中1:1で混合し、 $400 \times g$ 、10分間の遠心で細胞塊を形成させた後、45%ポリエチレングリコール4000をそれぞれ1mlずつ、約1分間かけて加え、融合反応を誘導した。無血清RPMI 1640 培地にて1回洗浄した後、10%牛胎児血清を含むRPMI 1640 培地にて 1×10^6 個/mlに調整し、96穴平底マルチウエルプレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。24時間後、ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-5} Mを含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640 培地(HAT培地)を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え、以後2~3日おきに各ウエルの培地を約半量ずつ HAT 培地に交換した。2~4週間後、ハイブリドーマの増殖が見られたウエルについては、ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、チミジン 1.6×10^{-5} Mを含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640 培地(HT培地)に交換し、以後2~3日おきに同培地の交換を行なった。HT培地で約2週間培養した後、選

できる。

実施例3: T8抗原陽性のサブレッサーT細胞-細胞障害性T細胞亜群からの産生

フィコールバックを用いた密度勾配遠心法により得たヒト末梢血リンパ球と、Eロゼット形成反応を亢進することが知られている臭化2-アミノエチルisonチオウロニウム 0.14 M で処理したヒツジ赤血球とを1:1000の割合で混合後、遠心し、4℃で2時間放置し、Eロゼットを形成させる。その後、フィコールバックを用いて、Eロゼット陰性細胞と、Eロゼット陽性細胞とに分離し、低張処理により、ヒツジ赤血球を溶血させ、Eロゼット陽性T細胞分画を得た。一方、Eロゼット陰性細胞は、プラスチックシャーレへの付着により、非付着性のB細胞分画および付着性の単球分画をそれぞれ得た。

さらに、Eロゼット陽性T細胞分画は、OKT8およびOKT4モノクローナル抗体を用いたパンニング法(Reinherz ら、Clin. Immunol.

Immunopathol. 21巻 257頁 (1981年)により、T 8 抗原陽性およびT 4 抗原陽性のT細胞亜群に分離した。まず、Eロゼット陽性T細胞と、マウス抗OKT 8あるいはOKT 4モノクローナル抗体を4℃で、1時間反応させた後、あらかじめヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を付着させておいたプラスチックディッシュに37℃で1時間インキュベートすることにより付着させた。非付着性細胞を回収した後、2回緩やかにリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、さらに付着性細胞(T 8 陽性あるいはT 4 陽性細胞)を、強くビペッティングすることによりディッシュから回収した。

上記の方法により得られた種々の細胞分画、すなわち、Eロゼット陽性T細胞分画、Eロゼット陰性のプラスチックディッシュ非付着性B細胞分画、Eロゼット陰性プラスチックディッシュ付着性単球分画、およびT 8 抗原あるいはT 4 抗原陽性T細胞分画を、それぞれ 5×10^6 個/mlの細胞濃度に調整し、Con A $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で48時間、

ついて、以下の通り実験を行なった。なお、本因子の活性は次のように、ラット骨髓細胞を用いて評価した。

実験例1：ラット骨髓細胞を用いた活性測定法

培養容器として96穴マイクロテストプレート(コーニング社製)を使用し、10%熱不活化牛胎児血清およびカナマイシン $60 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むRPMI 1640 培地を用い、調整したラット骨髓細胞懸濁液(5×10^6 個/ml) 0.1mlと、希釈試料0.1mlを混合し、5%炭酸ガス含有空気中37℃で12時間培養した。次いで、 ^3H -チミジン(比活性5 Ci/mmol、アマシャム社製)を $0.5 \mu\text{Ci}/\text{ウェル}$ の濃度で添加し、さらに4時間培養後、セルハーベスターを用いてグラスファイバーフィルターにて細胞を収集した。細胞内の残存放射性活性をトルエンシンチレーターを用い、液体シンチレーションカウンターにより測定し、対照との比較から、本因子の活性を求める。また、次の式から、 ^3H -チミジン取り込みの抑制百分率を算出

37℃で刺激し、その培養上清を得た。

これらの種々の細胞分画を用いて得られたCon A 刺激細胞培養上清の、細胞DNA合成抑制因子の活性をラット骨髓細胞を用いて測定した結果、Eロゼット陽性T細胞分画に細胞のDNA合成を80%以上抑制する活性が認められた。一方、Eロゼット陰性非付着性細胞(B細胞分画)およびEロゼット陰性付着性細胞(単球分画)については本因子の活性は認められなかった。

さらに、T 8 抗原陽性(T 4 抗原陰性)T細胞分画をCon A で刺激した培養上清に、強い細胞DNA合成抑制活性が認められたが、T 4 抗原陽性(T 8 抗原陰性)T細胞分画により得られた培養上清に本因子の活性は認められなかった。以上の結果から、本細胞DNA合成抑制因子は、T 8 抗原陽性のサブレッサーT細胞-細胞障害性T細胞亜群から産生されることが明らかとなった。

実験例

本発明の細胞DNA合成抑制因子の生物活性に

して、本因子の活性の指標とすることもできる。

$$\text{抑制百分率} = \left[1 - \frac{\text{試料を添加した場合のcpm}}{\text{試料未添加の場合のcpm}} \right] \times 100$$

さらに、必要に応じて、力価は試料の希釈度と抑制百分率を正規確率紙などにプロットし、50%の ^3H -チミジン取り込み抑制百分率を与える希釈度を求め、単位(U)で表示することができる。

以下の生物活性評価において、 ^3H -チミジン取り込みを使用する場合には、上記方法と同様に ^3H -チミジンの細胞内の残存放射性活性および取り込みの抑制百分率を算出して、本細胞DNA合成抑制因子の活性の指標とした。

実験例2：マイトジェンによって誘導されるヒト末梢血リンパ球のDNA合成および抗体産生に対する抑制効果

比重遠心法によって得られたヒト末梢血リンパ球を10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地にて 5×10^6 個/mlに調整した後、種々のマイトジ

エン(スタフィロコッカス・アウレウス・コウワン I (SAC) 0.003%、ボークウィードマイトジェン(PWM) 1/100 希釈、フィトヘマグルチニン(PHA) 5 μ g/ml、コンカナバリン A (Con A) 5 μ g/ml) を添加し、あらかじめ細胞 DNA 合成抑制因子を含む試料 (100 μ l) を入れておいた 96 穴平底マルチウエルプレートの各ウエルに 100 μ l ずつ加えた。37℃、5%炭酸ガス条件下で 48~72 時間培養した後、 3 H-チミジンを 0.5 μ Ci/ウエル加え、さらに同条件下で 4 時間培養した。セルハーベスターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した結果を第 2 表に示す。また、以下表中、カッコ内の数字は抑制百分率(%)を示し、SEM は標準偏差を示す。

第 2 表：種々のマイトジェンによって誘導されるヒト末梢血リンパ球の DNA 合成抑制効果

| 細胞 DNA 合成抑制因子 | マイトジェンに対する応答 (cpm \pm SEM) | | | | |
|---------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | — | PWM | SAC | PHA | Con A |
| 0 % | 3779 \pm 634 | 12483 \pm 4895 | 13922 \pm 3391 | 10351 \pm 727 | 25552 \pm 3858 |
| 25 % | 3463 \pm 150 (8.4) | 6369 \pm 1663 (49.0) | 6847 \pm 1539 (50.8) | 3337 \pm 308 (67.8) | 8389 \pm 44 (67.2) |

表より明らかなように、細胞 DNA 合成抑制因子を含む試料は、同因子を含まない対照に比して 3 H-チミジンの取り込みを 50~70% 抑制した。

また、スタフィロコッカス・アウレウス・コウワン I およびボークウィードマイトジェンに関しては、上述の条件下で 6 日間培養した後に、培養上清を回収し、その上清に含まれるイムノグロブリン M (IgM) 量を、また、マイトジェンを含まない状態で同条件下 6 日間培養した後の培養上清に含まれるイムノグロブリン G (IgG) 量をエンザイム・リンクド・イムノソルベント・アッセイ

(ELISA) 法により定量したところ第 3 表に示すように IgM 産生量および IgG 産生量は細胞 DNA 合成抑制因子を含む試料によって、それぞれ 60~80%、および 20~40% 抑制された。

第 3 表：PWM または SAC によって誘導されるヒト末梢血リンパ球の IgM 抗体産生および自然的 IgG 抗体産生に対する抑制効果

| 細胞 DNA 合成抑制因子 | マイトジェンに対する応答 (ng/ml \pm SEM) | | | | | |
|---------------|--------------------------------|---------------------------|------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | — | | PWM | | SAC | |
| | IgM | IgG | IgM | IgG | IgM | IgG |
| 0 % | 4 \pm 1 | 287 \pm 7 | 728 \pm 139 | 195 \pm 34 | 907 \pm 201 | 324 \pm 22 |
| 25 % | — | 188 \pm 26 (34.5) | 142 \pm 1 | 101 \pm 1 (80.5) (48.2) | 595 \pm 165 (34.4) | 156 \pm 20 (51.9) |

実験例 3：培養腫瘍細胞の DNA 合成および細胞増殖に対する抑制効果

種々の培養腫瘍細胞 (CCRF-SB、RPMI 8226、HSB-2、K 562、NS-1、SP-2) を 10% 牛胎児

血清を含む RPMI 1640 培地にて 1×10^5 個/ml に調整し、あらかじめ細胞 DNA 合成抑制因子を含む試料 (100 μ l) を入れておいた 96 穴平底マルチウエルプレートの各ウエルに 100 μ l ずつ加えた。37℃、5%炭酸ガス条件下で 24 時間培養した後、 3 H-チミジンを 0.5 μ Ci/ウエル加え、さらに同条件下で 4 時間培養した。セルハーベスターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した結果を第 4 表に示す。

第 4 表：種々の培養細胞の 3 H-チミジン取り込みに対する抑制効果

| 細胞 DNA 合成抑制因子 | 培養細胞の 3 H-チミジン取り込み (cpm \pm SEM) | | | |
|---------------|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | CCRF-SB | RPMI 8226 | CCRF-HSB-2 | K 562 |
| 0 % | 10407 \pm 1017 | 4496 \pm 1896 | 4109 \pm 1137 | 7819 \pm 227 |
| 25 % | 2199 \pm 171 (78.9) | 1882 \pm 56 (58.1) | 2114 \pm 114 (48.6) | 4637 \pm 122 (40.7) |

表より明らかなように、本発明の細胞DNA合成抑制因子を含む試料は、同因子を含まない対照に比して³H-チミジン取り込みを40～90%抑制した。

また、CCRF-SB、RPMI 8226、およびRPMI 1788を上述の条件下で72時間培養した後の生細胞数をトリパンブルー染色にて測定したところ、第5表に示すように本発明の細胞DNA合成抑制因子を含む試料は、対照と比較して、これらの細胞の増殖を50～70%抑制することが判明した。

第5表：種々の培養細胞の増殖（細胞数の増加）に対する抑制効果

—以下余白—

| 細胞DNA合成抑制因子 | 培養細胞の増殖（生細胞数/μl） | | |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | CCRF-SB | RPMI 8226 | RPMI 1788 |
| 0% | 2.2×10^5 | 2.1×10^5 | 1.1×10^5 |
| 12.5% | 1.5×10^5 (31.8) | 1.0×10^5 (52.4) | 0.8×10^5 (27.3) |
| 25.0% | 1.0×10^5 (54.5) | 0.9×10^5 (57.1) | 0.5×10^5 (54.5) |
| 50.0% | 0.6×10^5 (72.7) | 0.5×10^5 (76.2) | 0.4×10^5 (63.6) |

実験例4：インターロイキン-2（IL2）によって誘導されるIL2依存性マウス細胞株CTLL-2のDNA合成に対する抑制効果

IL-2依存性マウス細胞株CTLL-2を10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地にて 1×10^5 個/μlに調整した後、組換えヒトインターロイキン-2（r-IL-2）を添加（200U/μl）し、あらかじめ細胞DNA合成抑制因子を含む試料（100μl）を入れておいた96穴平底マルチウエルプレートの各ウエルに100μlづつ加

によって50～60%抑制された。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、セファクリルS-200を用いたゲル濾過による溶出パターンを、第2図は固定化コンカナバリンAセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによる溶出パターンを、第3図は分取用等電点電気泳動による泳動パターンを、そして、第4図はFPLC-Mono Qカラムを用いた食塩（0～1.0M）の直線的濃度勾配による溶出パターンをそれぞれ示す。

また、各図中 ●—● は細胞DNA合成抑制因子の活性を示すトリチウムチミジンの取り込みの抑制百分率（%）を、— は吸光度280nm（0.0.200）を、--- はpHを、----- は食塩による直線的濃度勾配をそれぞれ表わす。

第5図は、ヒト末梢血リンパ球を種々の細胞集団に分画した場合の、本発明の細胞DNA合成抑制因子の産生を示す。

えた。37℃、5%炭酸ガス条件下で20時間培養した後、³H-チミジンを0.5μCi/ウエル加え、さらに同条件下で4時間培養した。セルハーベスターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。その結果を第6表に示す。

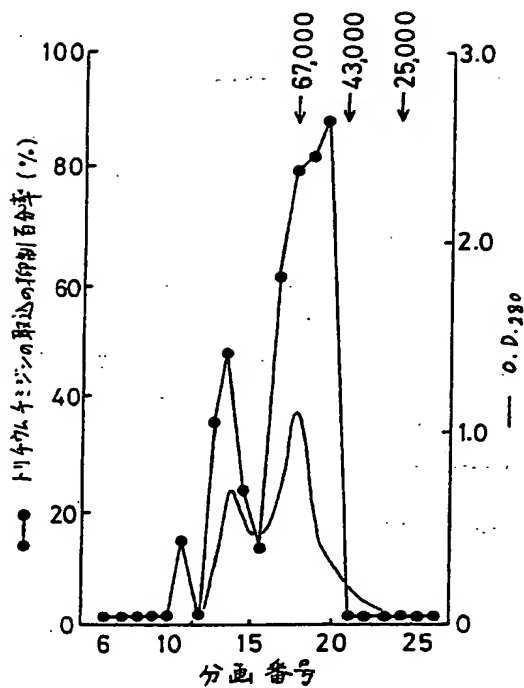
第6表：インターロイキン-2（IL2）依存性マウス細胞株CTLL-2のIL2応答に対する抑制効果

| 細胞DNA合成抑制因子 | IL2 (単位/μl) | CTLL-2の ³ H-チミジン取り込み (cpm ± SEM) |
|-------------|----------------|--|
| 0% | 0 | 1826 ± 177 |
| 0% | 200 | 13623 ± 634 |
| 3.13% | 200 | 6834 ± 159 (49.8) |
| 6.25% | 200 | 6741 ± 87 (50.5) |
| 12.5% | 200 | 5113 ± 2926 (62.5) |

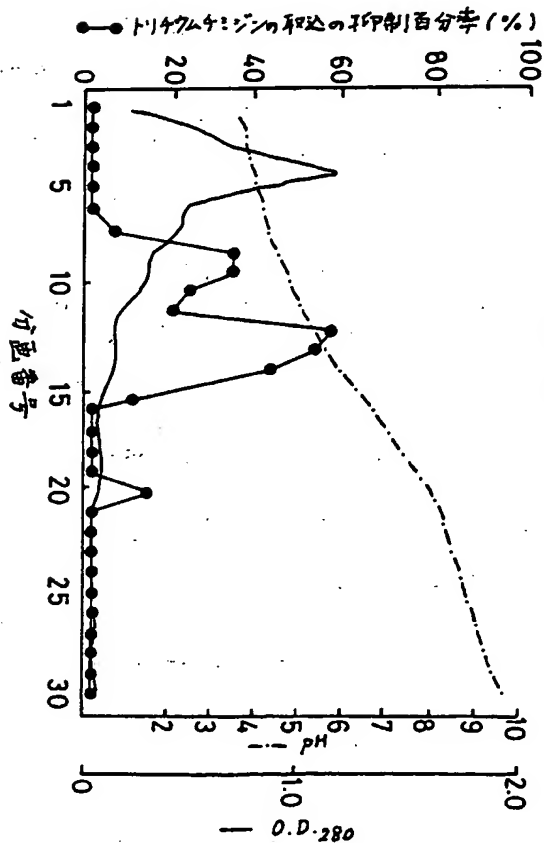
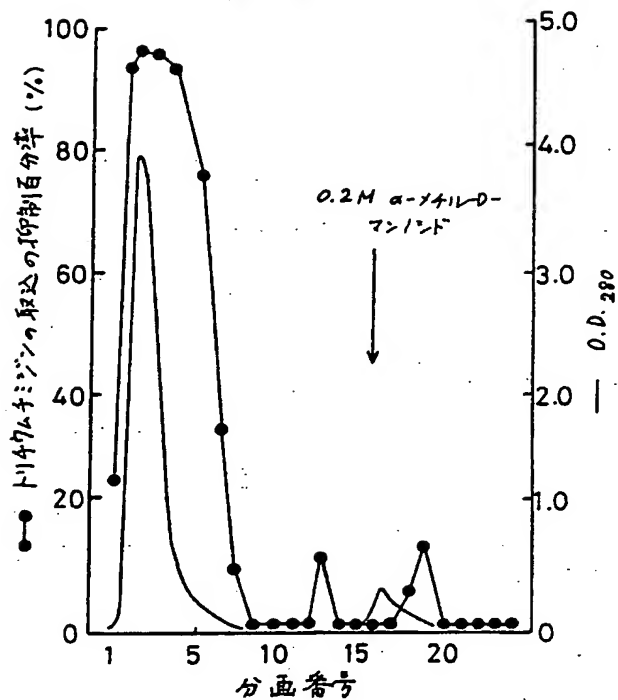
表から明らかなように、CTLL-2のIL2に対する応答は、本発明の細胞DNA合成抑制因子試料

特許出願人 吉富製薬株式会社
代理人 弁理士 高宮城 勝

第1図

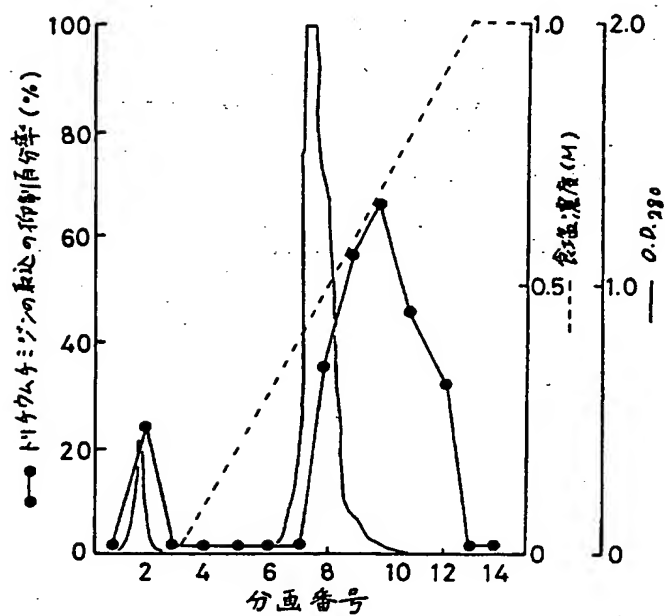


第2図



第3図

第4図



第 5 図

トリチウムチミジンの取り込み抑制率 (%)

